

**ANTITUMOR AGENT INCLUDING 10 TRANS, 12 CIS-CONJUGATED LINOLEIC ACID AS AN ACTIVE INGREDIENT****Publication number:** JP2003171272**Publication date:** 2003-06-17**Inventor:** YAMAZAKI MASAO; KOGA YASUKO; TACHIBANA HIROFUMI; YAMADA KOUJI; TSUTSUMI KENTARO**Applicant:** RINORU OIL MILLS CO LTD; SANGAKU RENKEI KIKO KYUSHU KK**Classification:**

**- international:** A61K31/375; A61K31/201; A61K31/231; A61K31/56; A61K31/7024; A61K31/715; A61P35/00; C11C3/00; A61K31/375; A61K31/185; A61K31/21; A61K31/56; A61K31/7024; A61K31/715; A61P35/00; C11C3/00; (IPC1-7): A61K31/201; A61K31/231; A61K31/375; A61K31/56; A61K31/7024; A61K31/715; A61P35/00; C11C3/00

**- european:****Application number:** JP20010374793 20011207**Priority number(s):** JP20010374793 20011207[Report a data error here](#)**Abstract of JP2003171272**

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide an antitumor agent that contains, as an active ingredient, a fatty acid or its derivatives having excellent antitumor activity and is safe with reduced side effects.

**SOLUTION:** The antitumor agent contains 10 trans, 12 cis-conjugated linoleic acid as an active ingredient. The 10 trans, 12 cis-conjugated linoleic acid is used in the form of a free fatty acid, an ester of the fatty acid, metal salts thereof, pharmaceutically acceptable form or their mixture. Foods and medicines having the antitumor action are provided by using the 10 trans, 12 cis-conjugated linoleic acid and derivatives.

**COPYRIGHT:** (C)2003,JPO

---

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-171272

(P2003-171272A)

(43)公開日 平成15年6月17日(2003.6.17)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームコード*(参考)
A 6 1 K 31/201		Λ 6 1 K 31/201	4 C 0 8 6
31/231		31/231	4 C 2 0 6
31/375		31/375	4 H 0 5 9
31/56		31/56	
31/7024		31/7024	
審査請求 未請求 請求項の数7 O L (全 6 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号	特願2001-374793(P2001-374793)	(71)出願人 591184437 リノール油脂株式会社 東京都中央区日本橋2丁目13番12号
(22)出願日	平成13年12月7日(2001.12.7)	(71)出願人 800000035 株式会社産学連携機構九州 福岡県福岡市東区箱崎6丁目10番1号
		(72)発明者 山 崎 正 夫 福岡県福岡市東区名島1-2-8-A203
		(72)発明者 古 賀 康 子 三重県四日市市三滝台3-5-6
		(74)代理人 100076812 弁理士 吉武 賢次 (外3名)
		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 10トランス, 12シス-共役リノール酸を有効成分とする抗腫瘍剤

(57)【要約】

【課題】 優れた抗腫瘍活性を有し、かつ安全性が高く副作用の少ない脂肪酸またはその誘導体を有効成分として含有する抗腫瘍剤を提供する。

【解決手段】 10trans, 12cis-共役リノール酸を有効成分とする抗腫瘍剤。10trans, 12cis-共役リノール酸は、例えば脂肪酸、または該脂肪酸のエステル、金属塩、その他の薬理学上許容される形態物またはこれらの混合物の形態である。上記の10trans, 12cis-共役リノール酸を含有して成る、抗腫瘍作用を有する食品または医薬品。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 10trans, 12cis-共役リノール酸を有効成分とする抗腫瘍剤。

【請求項2】 10trans, 12cis-共役リノール酸が、脂肪酸、または該脂肪酸のエステル、金属塩、その他の薬理上許容される形態物またはこれらの混合物の形体である、請求項1に記載の抗腫瘍剤。

【請求項3】 上記脂肪酸のエステルが、上記脂肪酸と、炭素数1~38のアルコール、エチレングリコール、プロピレングリコールおよびグリセリンからなる群から選ばれた1種または2種以上のアルコール類、ポリグリセリン、ステロール類、糖類またはアスコルビン酸等とのエステルである、請求項1または2に記載の抗腫瘍剤。

【請求項4】 上記脂肪酸の金属塩が、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、亜鉛塩およびマグネシウム塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の塩である、請求項1または2に記載の抗腫瘍剤。

【請求項5】 請求項1~4のいずれか一項に記載の10trans, 12cis-共役リノール酸を含有して成る、抗腫瘍作用を有する食品。

【請求項6】 10trans, 12cis-共役リノール酸を含有する油脂製品の形態である、請求項5に記載の食品。

【請求項7】 医薬品として用いられる、請求項1~4の何れか一項に記載の抗腫瘍剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は食品または医薬用途に有用な抗腫瘍剤、更に具体的には、特に種々の異なるタイプの癌の治療に有効な抗腫瘍剤に関する。

【0002】

【従来の技術】 厚生省の「人口動態統計」における日本人の主要死因別年齢調整死亡率において、1980年代から現在に至るまで男性および女性とともに悪性新生物（癌）が第一位となっており、近年まで低下傾向を示さず、横ばいか微増している。このため、癌の治療及び症状の軽減に適した治療方法を開発するために多くの研究が行われているが、化学治療の分野においては、抗生物質、代謝拮抗物質、アルキル化剤、ホルモン剤などが癌細胞に有効な抗腫瘍剤として見いだされているものの、これらの抗腫瘍剤は、癌細胞を攻撃するだけでなく、正常細胞にも作用することから、嘔吐、悪心、食欲不振、脱毛などの副作用を引き起こす問題が発生しており、これら副作用の少ない新規な治療薬の開発が望まれている。

【0003】 最近、リノール酸をアルカリ共役化して得られる共役リノール酸が乳癌抑制作用を有する旨の報告がなされている(Cancer Research, 51, 6118-6124, 1991)。更に、共役リノール酸の異性体においては、cis9, trans11-共役リノール酸および10trans, 12cis-共役リノール酸は同等の発ガン抑制効果を有する旨の報告(Pro

c. Soc. Exp. Biol. Med., 223, 8-13, 2000) や、cis 9, trans11-共役リノール酸異性体のみが生物学的に活性を示し、発癌抑制を発現させることを推測する旨の報告(Nutrition Review, 53, 83-89, 1995) がなされている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】 本発明は、優れた抗腫瘍活性を有し、かつ安全性が高く副作用の少ない脂肪酸またはその誘導体を有効成分として含有する、食品および医薬用の抗腫瘍剤を提供することを目的とする。

【0005】

【課題を解決するための手段】 本発明者等は、上述目的を達成すべく鋭意研究を重ねた結果、共役リノール酸の異性体の中で優れた抗腫瘍活性を有するのは9cis, 11trans- (9シス, 11トランス-) 共役リノール酸ではなく、10trans, 12cis- (10トランス, 12シス-) 共役リノール酸に高い抗腫瘍作用があることを見出し、この知見を基に本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は、10trans, 12cis-共役リノール酸を有効成分とする抗腫瘍剤、さらに具体的には該異性体が脂肪酸、あるいは該脂肪酸のエステルもしくは金属塩またはその他の薬理上許容される形態物を有効成分とする、食品または医薬用の抗腫瘍剤を提供するものである。別の観点から、本発明は、10trans, 12cis-共役リノール酸を含有してなる、抗腫瘍作用を有する食品または医薬品に関するものである。

【0006】

【発明の実施の形態】 本発明においては、共役リノール酸の異性体の中で10trans, 12cis-共役リノール酸のみが有効成分となる。10trans, 12cis-共役リノール酸は、後述のようにリノール酸あるいはリノール酸含有材料（油脂など）を原料とし、当分野で既知の方法を用いて目的の異性体を選択的に得るか、あるいは遊離の形態として高純度品が市販されているのでそれを使用することもできる。

【0007】 10trans, 12cis-共役リノール酸の形態としては、脂肪酸のままでもよく、またエステルもしくは金属塩の形態であってもよい。エステルとしては、10trans, 12cis-共役リノール酸の脂肪酸と、炭素数1~38好ましくは1~10のアルコール（例えば脂肪族アルコール、高級アルコールなど）、エチレングリコール、プロピレングリコールおよびグリセリンからなる群から選ばれた1種または2種以上のアルコール類、ポリグリセリン、ステロール類（ $\beta$ -シトステロールなど）、糖類（単糖、二糖、オリゴ糖、多糖など）、アスコルビン酸等とのエステルなどが挙げられる。また、金属塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、亜鉛塩およびマグネシウム塩からなる群から選ばれた1種又は2種以上の金属塩などが挙げられる。さらに、本発明に使用される10trans, 12cis-共役リノール酸は、上記のエステルもし

くは金属塩の形態の他に、アミドやリン脂質など他の任意の薬理学的に許容される形態物であってもよい。

【0008】本発明による「10trans,12cis-共役リノール酸を有効成分とする抗腫瘍剤」は、抗腫瘍または腫瘍予防食品（飼料を包含する）抗腫瘍用医薬品として用いることができる。

【0009】抗腫瘍（または腫瘍予防）食品の具体的態様の一例として、リノール酸含有油脂（例えば、サフラワー油、ひまわり油など）を通常のアルカリ共役化反応に付することにより油脂中のリノール酸を共役リノール酸に転化させて、共役リノール酸含有脂肪酸を得て、これをリパーゼにより9cis, 11trans異性体選択的エステル化法を行い、それに次ぐ分子蒸留、酵素反応、尿素包括など既知の方法を組合せることにより、50%以上の10trans,12cis-共役リノール酸含有脂肪酸を得ることができる。

【0010】上記のアルカリ共役化反応は、アルカリ有機溶媒液中にて脂肪酸を共役化して共役脂肪酸に転化する反応であり、公知の方法を用いることができる。例えばアルカリとして水酸化カリウム、有機溶媒としてエチレングリコールを代表的に使用する方法（第34回油化学討論会講演要旨集、p171（1995）、基準油脂分析試験法2.4.16-17）、また好ましい例として、有機溶媒としてプロピレングリコールを使用する共役化率の向上した方法（特許第3017108号公報）等が知られており、これらの既知の方法を用いて行なうことができる。上記共役リノール酸の選択的エステル化法は9cis,11trans-共役リノール酸を優先的にエステル化する方法であり、例えばCandida rugosa由来のリパーゼを用いた方法（平成13年度日本生物工学会要旨集p156、No.241）等の既知の方法を用いて行なうことができる（後記実施例参照）。上記分子蒸留は、例えば120～190℃、0.5～0.005mmHgの条件を用いて行なうことができる。上記酵素反応は、上記リパーゼを用いた方法を必要に応じてさらに1回または複数回繰り返してもよい。反応条件は任意に設定することができるが、例えば、反応混合液（アルカリ共役化で得られた共役リノール酸含有脂肪酸／ラウリルアルコール混合液）に対して酵素4～250U/gの濃度で使用し30℃で16時間程度の条件で反応を行なうことができる。上記尿素包括は、例えば分子蒸留後の分画液に5倍量メタノール、1倍量の尿素を加えて60℃まで加温することで行なうことができる。また、上記アルカリ共役化反応の後に、Pseudomonas sp.由来のリパーゼを作用させる方法（特開2001-169794号公報）を用いて、10trans,12cis-共役リノール酸を選択的にエステル化することにより、最終的に加水分解後10trans,12cis-共役リノール酸含有脂肪酸を得ることができる。

【0011】上記の方法で得られる10trans,12cis-共役リノール酸含有脂肪酸中の10trans,12cis-共役リノール酸含量は通常50%～100%、好ましくは80～100%である。

ここで100%未満の場合の残りの成分は他の異性体（9cis, 11trans型、9cis,11cis/10cis,12cis混合型、9trans,11trans-/10trans,12trans混合型）、オレイン酸等である。

【0012】上記選択的エステル化法に代えてクロマトグラフィー（例えば、銀イオンカラムを用いた高速液体クロマトグラフィー（米国特許第6,153,774号公報）など）を用いることにより、10trans,12cis-共役リノール酸含有脂肪酸を分離、分取して得ることができる。

【0013】本発明による食品は10trans,12cis-共役リノール酸を含有してなるものであり、油脂製品（脂肪酸、グリセリド）の形態が好ましい。脂肪酸の形態としては上記のようにして得られた10trans,12cis-共役リノール酸含有脂肪酸を使用することができ、グリセリドの形態としては上記のようにして得られた脂肪酸とグリセリンを通常の方法によりリパーゼを用いてエステル化したものを用いることができる。また本発明においては、10trans,12cis-共役リノール酸が他の種々のエステル、金属塩、その他の薬理学的に許容される形態物またはこれらの混合物の形態であってもよいことは前記した通りである。また、本発明による抗腫瘍剤を用いた食品、すなわち抗腫瘍作用を有する食品（飼料（ペットフードを含む）を包含する）もしくは腫瘍抑制用食品は、上記に例示したような10trans,12cis-共役リノール酸含有油脂製品の形態で用いることができるほか、食用油脂組成物（植物性油脂、動物性油脂、加工油脂など）、食用乳化油脂組成物（マーガリン、マヨネーズなど）、ベーカリー製品（パン、ケーキ類）、調理食品（弁当、惣菜など）、飲料（ジュース、ソフトドリンク類）などの食品に混合して用いてもよい。本発明において、他一般食品中に配合する場合は、食品中の抗腫瘍剤は10trans,12cis-共役リノール酸の量として通常1～5重量%程度である。

【0014】本発明の抗腫瘍剤を医薬品として用いる場合、その形態は特に制限されるものではなく、投与方法や適用される腫瘍の種類、形状および存在部位などの条件に応じて、注射液、座薬、軟膏、錠剤、カプセル、散剤、顆粒剤、ドリンク剤などの種々の形態を適宜選択することができる。従って、上記したような本発明の抗腫瘍剤をそのまま医薬品として用いることができるほか、必要に応じて担体、希釈剤もしくは賦形剤など通常の種々の添加物（例えば糖類、デンプン類、アルコール類、アラビアゴムなど）と組合せることができる。

【0015】本発明による抗腫瘍剤の摂取もしくは投与量は、治療上有効量であり、腫瘍の種類などにより一概に言えないが、体重60Kgの成人の場合、1日当たり上記10trans,12cis-共役リノール酸の量として通常10～5000mg、好ましくは20～3000mgである。また本発明の抗腫瘍剤は公知の抗腫瘍剤あるいは他の治療剤と併用することもできる。

【0016】共役リノール酸の上記2種の異性体が同等の活性を示すという従来の報告に関連し、10trans, 12cis-共役リノール酸（および9cis, 11trans-共役リノール酸）の抗腫瘍剤としての作用機序については、この化合物が抗酸化活性を有するという説（Cancer Research, 50, 1097-1101, 1990）や、プロスタグランジンE<sub>2</sub>の合成系に関与しているという説（Lipids, 32, 725-730, 1997）が報告されているが、何れの機序をも否定する報告（日本油脂学会誌, 48, 981-988, 1999）が出てきており、はっきりしていないのが現状である。また、従来の技術で前記のように9cis, 11trans-共役リノール酸のみが活性を示すという報告があったが、本発明により、10trans, 12cis-共役リノール酸が極めて有効な抗腫瘍効果を示すことが確認され、優れた抗腫瘍剤として期待される。

【0017】なお、本明細書において、%表示は特に断りのない限り重量%基準である。

【0018】

【実施例】以下の実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこの実施例によって限定されるものではない。

【0019】〔実施例1〕市販の10trans, 12cis-共役リノール酸（純度98%：マトレア社製、米国）を入手し、これを本発明の抗腫瘍剤とした。また、比較として9cis, 11trans-共役リノール酸（純度98%：マトレア社製、米国）を使用した。ラット肝癌細胞株dRLh-84を血清1%存在下DMEMにおいて、9cis, 11trans-共役リノール酸又は10trans, 12cis-共役リノール酸を添加し培養した結果、9cis, 11trans-共役リノール酸は細胞毒性効果を示さず、10trans, 12cis-共役リノール酸のみ認められた（図1）。続いて、ラット肝癌細胞株dRLh-84を血清1%存在下DMEMを用いて培養したところ、10trans, 12cis-共役リノール酸10 $\mu$ M添加によって著しい細胞毒性効果が認められた。一方、9cis, 11trans-共役リノール酸は細胞毒性効果を示さず、抗腫瘍効果が10trans, 12cis-共役リノール酸に特異的であることが明らかになった（図2）。また、同濃度において10trans, 12cis-共役リノール酸は、ラット正常肝細胞株RLN-10には顕著な細胞毒性効果を与えず、抗腫瘍効果は癌細胞選択的に発現することが示された（図3）。

【0020】〔実施例2〕実施例1の方法に準じて、ヒト乳癌細胞株MCF-7を活性炭処理によるエストロゲン除去を行なった血清5%存在下RPMI-1640培地において、10trans, 12cis-共役リノール酸を添加し培養した結果、10および100 $\mu$ Mの濃度で細胞増殖抑制効果が認められた。抗腫瘍効果は、9cis, 11trans-共役リノール酸においては認められず、10trans, 12cis-共役リノール酸のみがエストロゲン非依存的に乳癌細胞の増殖を抑制することが明らかとなった（図4）。

【0021】〔実施例3〕10trans, 12cis-共役リノール酸（含有脂肪酸）の調製

サフラワー油を原料とし、有機溶媒としてプロピレングリコールを使用するアルカリ共役化反応（特許第3017108号公報）により脂肪酸を共役化し、9cis, 11trans-共役リノール酸と10trans, 12cis-共役リノール酸の異性体をそれぞれ約33%ずつ含む共役リノール酸含有油脂混合物を得た。次いで、得られたこの混合物とラウリルアルコールとの混合液（1:1 mol/mol）にCandida rugosa由来のリパーゼ（名糖産業社製）を20U/g混合液の濃度で、30℃、16時間の条件で作用させて選択的エステル化を行い、9cis, trans-11-共役リノール酸を10trans, 12cis-共役リノール酸よりも優先的にエステル化させた（エステル化率約50%）。この反応混液を120~190℃、0.5~0.005mmHgの条件で分子蒸留したところ、10trans, 12cis-共役リノール酸を多く含む脂肪酸画分と9cis, 11trans-共役リノール酸を多く含むエステル画分に分画できた。両画分をさらに上記の酵素反応、分子蒸留、および尿素包括（分画液に5倍量メタノール、1倍量の尿素を加えて60℃まで加温）することにより、10trans, 12cis-共役リノール酸高含有脂肪酸生成物が得られた。生成物中の10trans, 12cis-共役リノール酸含有量は78.8%であり、残りの成分は9cis, 11trans-共役リノール酸4.2%、9cis, 11cis/10cis, 12cis共役リノール酸4.7%、9trans, 11trans/10trans, 12trans共役リノール酸4.9%、オレイン酸2.5%等であった。

【0022】

【発明の効果】上述してきたように、本発明によれば、優れた抗腫瘍活性を有し、かつ安全性が高く副作用の少ない、種々の異なるタイプ（由来組織など）の癌の治療に有効な抗腫瘍剤を提供することができる。本発明抗腫瘍剤において、従来、共役リノール酸の2種の異性体の両方が同等にまたは9cis, 11trans-共役リノール酸のみが生物活性を有すると報告されていた状況下で、10trans, 12cis-共役リノール酸のみが抗腫瘍効果を示したことは思いがけなかったことと解される。

【図面の簡単な説明】

【図1】2種の共役リノール酸異性体の、ラット肝癌細胞株dRLh-84の増殖に及ぼす影響を示すグラフである。コントロールは無添加のものである。

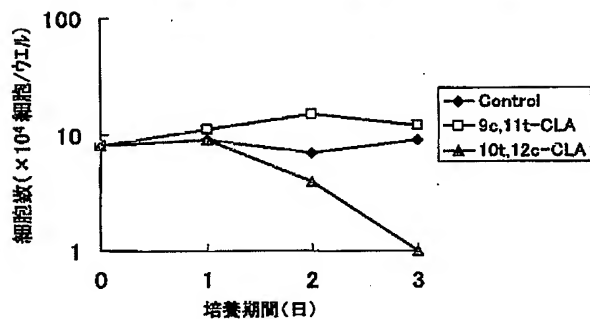
【図2】2種の共役リノール酸異性体の、ラット肝癌細胞株dRLh-84の生存率に及ぼす影響を示すグラフである。コントロールは無添加のものである。

【図3】2種の共役リノール酸異性体の、ラット正常肝細胞株RLN-10の増殖に及ぼす影響を示すグラフである。コントロールは無添加のものである。

【図4】2種の共役リノール酸異性体の、ヒト乳癌細胞株MCF-7の増殖に及ぼす影響を示すグラフである。コントロールは無添加のものである。

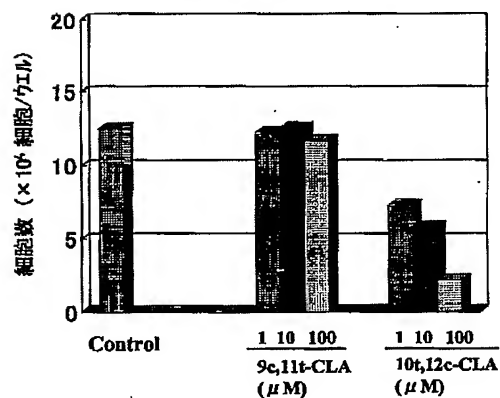
【図1】

ラット肝癌細胞株dRLh-84の増殖に及ぼす影響



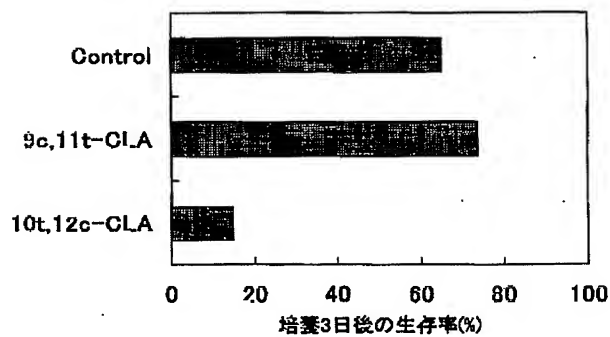
【図4】

ヒト乳癌細胞株MCF-7の増殖に及ぼす影響



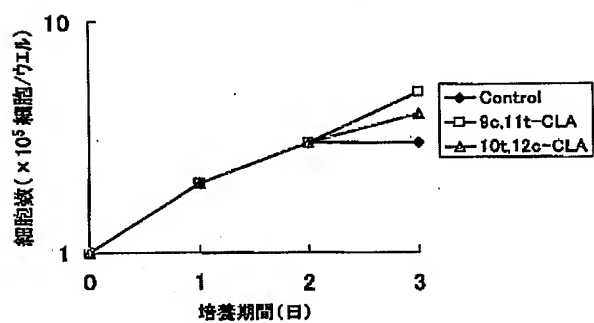
【図2】

ラット肝癌細胞株dRLh-84の生存率に及ぼす影響



【図3】

ラット正常肝細胞株RLN-10の増殖に及ぼす影響



## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	(参考)
A 6 1 K 31/715		A 6 1 K 31/715	
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	
C 1 1 C 3/00		C 1 1 C 3/00	
(72)発明者 立 花 宏 文		F ターム(参考) 4C086	AA02 BA18 DA08 EA03 EA21
福岡県福岡市東区香椎浜4-7-8-502			GA16 MA01 MA04 MA09 MA17
(72)発明者 山 田 耕 路			MA21 MA28 MA31 MA35 MA37
福岡県福岡市東区高美台1-1-8			MA41 MA43 MA52 MA60 MA66
(72)発明者 堤 賢太郎			NA14 ZB26
東京都中央区日本橋2丁目13番12号 リノ		4C206	AA01 AA02 DA04 DB07 DB43
ール油脂株式会社内			DB44 DB45 DB47 DB49 KA17
			MA01 MA04 MA13 MA21 MA28
			MA37 MA41 MA48 MA51 MA55
			MA57 MA61 MA63 MA72 MA80
			MA86 NA14 ZB26
		4H059	BA26 BA30 BA33 BA34 BB04
			BB06 BB57 EA40